

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/CN05/000508

International filing date: 15 April 2005 (15.04.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: CN
Number: 200410033864.X
Filing date: 15 April 2004 (15.04.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 05 July 2005 (05.07.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日： 2004. 04. 15

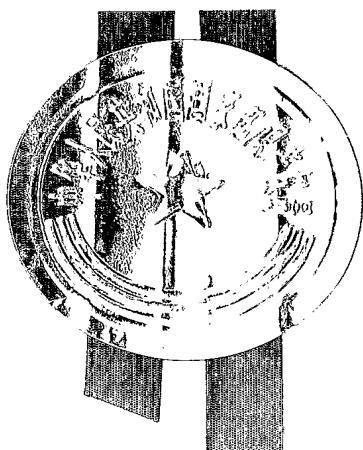
申 请 号： 200410033864. X

申 请 类 别： 发明

发明创造名称： 应用遗传标记和芯片预测糖尿病肾病危险的方法

申 请 人： 香港中文大学

发明人或设计人： 陈重娥、 伍楚贤、 苏咏仪



中华人民共和国
国家知识产权局局长

王素川

2005 年 5 月 24 日

权 利 要 求 书

1. 一种检测中国血统糖尿病患者已患有、将有可能发展成、或者疑似患有肾病的方法，包括如下步骤：

5 检测来自糖尿病患者的样品中是否含有下列多态性序列中的至少一种：ACE 基因的 I/D 基因型，AGT 基因的 M235T 基因型，ALR2 基因的 (CA)n-5'(z-2) 基因型，ALR2 基因启动子区的 C106T 基因型，TNF- α 基因的 G-308A 基因型，以及其互补序列，条件是不单独使用 ALR2 的基因型，其中多态性序列的存在表明该糖尿病患者已患有、将有可能发展成、或
10 者疑似患有肾病。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，还包括从患者中取样的步骤。

3. 根据权利要求 2 所述的方法，其中所取样品为血样。

15

4. 根据权利要求 1 至 3 任一项所述的方法，该方法还包括用 PCR 方法扩增基因 ACE、AGT、ALR2 或 TNF- α 的步骤。

20 5. 根据权利要求 4 所述的方法，其中扩增所用的引物为：扩增 ACE 基因使用的 SEQ ID NO. 1 与 SEQ ID NO. 2；扩增 AGT 基因使用的 SEQ ID NO. 3 与 SEQ ID NO. 4；扩增 TNF- α 基因使用的 SEQ ID NO. 5 与 SEQ ID NO. 6；扩增 ALR2 基因使用的 SEQ ID NO. 7 与 SEQ ID NO. 8 或 SEQ ID NO. 9 与 EQ ID NO. 10。

25 6. 根据权利要求 1 至 5 任一项所述的方法，其中所述患者为已患有、将有可能发展成、或者疑似患有 II 型糖尿病的患者。

7. 根据权利要求 1 至 6 任一项所述的方法，其中所述的 I/D 基因型含有 DD 基因型。

8. 根据权利要求 1 至 7 任一项所述的方法，其中所述的 G-308A 基因型含有 GG 基因型。

9. 检测中国血统糖尿病患者已患有、将有可能发展成、或者疑似患有肾病的芯片，该芯片包括下列多态性序列中的至少一种：ACE 基因的 I/D 基因型，AGT 基因的 M235T 基因型，ALR2 基因的(CA)_n-5'(z-2)基因型，ALR2 基因启动子区的 C106T 基因型，TNF-a 基因的 G-308A 基因型，以及其互补序列。

10 10. 根据权利要求 9 所述的芯片，其中所述的患者是已患有、将有可能发展成、或者疑似患有 II 型糖尿病的患者。

11. 根据权利要求 9 至 10 任一项所述的芯片，其中所述的 I/D 基因型含有 DD 基因型。

15 12. 根据权利要求 9 至 10 任一项所述的芯片，其中所述的 G-308A 基因型含有 GG 基因型。

20 13. 检测中国血统糖尿病患者已患有、将有可能发展成、或者疑似患有肾病的试剂盒，包括：

芯片，其包括以下多态性序列中的至少一种：ACE 基因的 I/D 基因型，AGT 基因的 M235T 基因型，ALR2 基因的(CA)_n-5'(z-2)基因型，ALR2 基因启动子区的 C106T 基因型，TNF-a 基因的 G-308A 基因型，以及其互补序列；以及

25 指导性材料，其指导如何检测糖尿病患者已患有、或有可能发展成或疑似患有肾病。

30 14. 根据权利要求 13 所述的试剂盒，其中所述的患者是已患有、将有可能发展成、或者疑似患有 II 型糖尿病的患者。

15. 根据权利要求 13 或 14 所述的试剂盒，其中所述的 I/D 基因型含有 DD 基因型。

16. 根据权利要求 13 到 15 任一项所述的试剂盒，其中所述的 G-308A
5 基因型含有 GG 基因型。

17. 检测中国血统糖尿病患者已患有、将有可能发展成、或者疑似患有肾病的试剂盒，包括

扩增基因 ACE、AGT、ALR2 或 TNF- α 的引物；以及
10 指导如何检测糖尿病患者已患有、或有可能发展成或疑似患有肾病的指导性材料。

18. 根据权利要求 17 所述的试剂盒，其中扩增所用的引物为：扩增
ACE 基因使用的 SEQ ID NO. 1 与 SEQ ID NO. 2；扩增 AGT 基因使用的
15 SEQ ID NO. 3 与 SEQ ID NO. 4；扩增 TNF- α 基因使用的 SEQ ID NO. 5
与 SEQ ID NO. 6；扩增 ALR2 基因使用的 SEQ ID NO. 7 与 SEQ ID NO. 8
或 SEQ ID NO. 9 与 EQ ID NO. 10。

说 明 书

应用遗传标记和芯片预测糖尿病肾病危险的方法

5 发明领域

本发明涉及使用一个或多个标记来检测中国血统糖尿病患者已患有、将有可能发展成或者疑似患有肾病的一种方法和芯片，特别是使用选自基因 ACE, AGT, ALR2 和 TNF-a 的一个或多个遗传多态性标记检测中国血统糖尿病患者已患有、将有可能发展成、或者疑似患有肾病的
10 一种方法和芯片，条件是不单独使用 ALR2 的基因型。

背景技术

糖尿病肾病是糖尿病患者的主要致病、致死原因。随着糖尿病在发达国家与发展中国家的流行，糖尿病目前已成为晚期肾病(ESRD)的最主要的原因，占所有使用肾脏替换治疗的新患者的 40 - 50 % (Ritz E, Rychlik I, Locatelli F, Halimi S, End-stage renal failure in type 2 diabetes: a medical catastrophe of worldwide dimensions, *Am J Kidney Dis*, 1999; 34: 795-808)。
15 中国是拥有最多糖尿病患者的三个国家之一，估计到 2025 年，糖尿病患者将增加到 4000 万人且该增长主要发生在中年人群中 (Chan J. C. N, Ng M. C. Y, Critchley J. A. J. H, Lee S. C, Cockram C. S, Diabetes mellitus-a special medical challenge from a Chinese perspective, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2001; 54: S19-27)，年轻型糖尿病与幼年肥胖症以及
20 新陈代谢综合症发病率的增高是导致这种状况的出现主要原因(Chan J. C. N, Ng M. C. Y, Lessons learned from young onset diabetes in China, *Current Diabetes Report*, 2003; 3: 101-107; Chan J. C. N, Cheung C. K, Cheung M. Y. F, Swaminathan R, Critchley J. A. J. H, Cockram C. S, Abnormal albuminuria as a predictor of mortality and renal impairment in Chinese patients with NIDDM, *Diabetes Care*, 1995; 18: 1013-1014; Chan J. C. N, Ko G. T. C, Leung D, Cheung R. C. K, Cheung M, So W. Y 等，The long
25 term effects of angiotensin converting enzyme inhibition and metabolic
30

control on cardiovascular and renal outcomes in hypertensive Type 2 diabetic patients, *Kidney International*, 2000; 57: 590-600)。在世界卫生组织多国糖尿病心血管病(WHO-MSVDD)的研究中发现，亚洲，特别是中国、日本患者比白人 II 型糖尿病患者有更高的 ESRD 发病率(Morrish N. J, Wang

- 5 S, Stevens L. K, Fuller J. H, Keen H, Mortality and causes of death in the WHO Multinational Survey of Vascular Diseases in Diabetes, *Diabetologia*, 2001; 44: S14-21)。

与白人糖尿病患者群中大多数患者死于心血管疾病形成对照的是，中国血统糖尿病患者致死的主要原因是晚期肾病 (ESRD) (Chan J. C. N,

- 10 Cheung C. K, Cheung MYF, Swaminathan R, Critchley J. A. J. H, Cockram C. S, Abnormal albuminuria as a predictor of mortality and renal impairment in Chinese patients with NIDDM, *Diabetes Care*, 1995; 18: 1013-1014)。

这些发现最近已被 WHO-MSVDD 证实(Morrish N. J, Wang S, Stevens L. K, Fuller J. H, Keen H, Mortality and causes of death in the WHO

- 15 Multinational Survey of Vascular Diseases in Diabetes, *Diabetologia*, 2001;

44: S14-21)。与这些发现一致，现已经证实疾病相关基因的等位基因频率和单元型具有种族间差别，这可能导致了疾病形成敏感性方面出现种族差异(Ng M, Wang Y, So W, Cheng S, Visvikis S, Zee R 等，Ethnic differences in the linkage disequilibrium and distribution of single nucleotide

- 20 polymorphisms in 35 candidate genes for cardiovascular diseases, *Genomics*, 2003: in press; Young RP, Thomas G. N, Critchley J. A. J. H, Tomlisnon B, Woo K. S, Sanderson J. E, Interethnic differences in coronary heart

diseaes mortality in 25 populations: associations with the angiotensin converting enzyme DD genotype frequency, *Journal of Cardiovascular Risk*, 1998; 5: 303-7)。考虑到疾病的持续时间对并发疾病的影响、年青与中年糖尿患者人群发病率的升高和发生糖尿病肾病的种族偏好，随着社会经济的发展，肾功能衰竭与心血管疾病将在我们越来越多的年青人群中流行(Chan J. C. N, Ng M. C. Y, Critchley J. A. J. H, Lee S. C, Cockram C.

- 25 S, Diabetes mellitus - a special medical challenge from a Chinese perspective, *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2001; 54: S19-27)。

以前我们报道过肾病有 30% 到 50% 的高发病率和中国血统糖尿病患者肾功能死亡与退化的尿标记的预测值(Chan J. C. N, Cheung J. C. K, Lau E. M. C, Woo J, Swaminathan R, Cockram C. S, The Metabolic Syndrome in Hong Kong Chinese-the inter-relationships amongst its components analysed by structural equation modeling, *Diabetes Care*, 1996; 19: 953-9)。我们已报道了在排除高血压与高血脂的情况下中国血统患者胰岛素抗性与糖尿病肾病之间的独立关系(Chan J. C. N, Tomlinson B, Nicholls M. G, Swaminathan R, Cheung C. K, Cockram CS, Albuminuria, insulin resistance and dyslipidaemia in Chinese patients with non-insulin-dependent diabetes (NIDDM), *Diabetic Medicine*, 1996; 13: 150-55)以及其分别与肥胖症、白蛋白尿症、血糖代谢异常之间的密切关系(Lee Z, Critchley J, Ko G. T, Anderson P, Thomas N, Young R, et al, Obesity and cardiovascular risk factors in Hong Kong Chinese, *Obesity Reviews*, 2002; 3: 178-182)。以家族为基础的研究与隔离分析(The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, Clustering of long term complications in families with diabetes in the diabetes control and complication trial, *Diabetes*, 1997; 46: 1829-1839)和基因组扫描已经证实了遗传因素在糖尿病肾病形成过程中起到了很强的作用(Imperatore G, Hanson RL, Pettitt D, Kobes S, Bennett P, Knowler W, Sib pair linkage analysis for susceptibility genes for microvascular complications among Pima Indians with type 2 diabetes. Pima Diabetes Gene Group, *Diabetes*, 1998; 47: 821-30; Imperatore G, Knowler W, Pettitt D, Kobes S, Bennett P, Hanson R, Segregation analysis of diabetic nephropathy in Pima Indians, *Diabetes*, 2000; 49: 1049-56)。血管紧张素系统(RAS)在调节系统与肾脏血流动力学和细胞组织生长方面起关键作用(Cooper M, Pathogenesis, prevention and treatment of diabetic nephropathy, *Lancet*, 1998; 352: 213-9)。AGT M235T 多态性 TT 基因型、ACE I/D 多态性 D 等位基因与白种人血统、日本人血统和中国人血统糖尿病患者患肾病有关系(Fujisawa T, Ikegami H, Kawaguchi Y, Hamada Y, Ueda H, Shintani M, et al, Meta analysis of association of insertion/deletion polymorphism of angiotensin I converting enzyme gene

with diabetic nephropathy and retinopathy, *Diabetologia*, 1998; 41: 47-53;
Young R. P, Chan J. C. N, Poon E, Critchley J. A. J. H, Cockram C. S,
Associations between albuminuria and angiotensinogen T235 and angiotensin
converting enzyme insertion/deletion polymorphisms in Chinese NIDDM
patients, *Diabetes Care*, 1997; 21: 431-7; Ringel J, Beige J, Kunz R,
Distler A, Sharma A, Genetic variants of the renin angiotensin system,
diabetic nephropathy and hypertension, *Diabetologia*, 1997; 40: 193-9).
由脂肪细胞分泌的细胞因子，即肿瘤坏死因子 α (TNF- α)是肥胖症与胰岛
素抗性的关联因子(Hotamisligil GS, Spiegelman BM, Tumor necrosis
factor : a key component of the obesity-diabetes link, *Diabetes*, 1994;
43: 1271-8), 而胰岛素抗性是包括中国糖尿病患者在内的肾病患者的一
个重要特征 (Chan J. C. N, Tomlinson B, Nicholls M. G, Swaminathan R,
Cheung C. K, Cockram C. S, Albuminuria, insulin resistance and
dyslipidaemia in Chinese patients with non-insulin-dependent diabetes
(NIDDM), *Diabetic Medicine*, 1996; 13: 150-55)。最近日本的研究表明
血清 TNF- α 水平的升高与 II 型糖尿病患者的肾病有确定的关系(Moriwaki
Y, Yamamoto T, Shibutani Y, Aoki E, Tsutsumi Z, Takahashi S, et al,
Elevated levels of interleukin 18 and tumor necrosis factor alpha in serum of
patients with type 2 diabetes mellitus : relationship with diabetic
nephropathy, *Metabolism: Clinical and Experimental*, 2003; 52: 605-8)。
关于这一点,已有报道 TNF- α 基因启动子区域的 G-308A 多态性与肥胖症、
胰岛素抗性(Dalziel B, Goskby A, Richman R, Bryson J, Caterson I,
Association of TNF alpha -308 G/A promoter polymorphism with insulin
resistance in obesity, *Obesity Research*, 2002; 10: 401-7)及 TNF- α 基因
转录活性增强有关(Kroeger K, Carville K, Abraham L, The -308 tumor
necrosis factor alpha promoter polymorphism effects transcription, *Molecular
Immunology*, 1997; 34: 391-99)。醛糖还原酶(ALR2)是多醇路径最关键的
酶, 多醇路径可以导致氧化压力增加和细胞内环境改变, 从而引起糖尿
病微血管病(Hodgkinson A, Sondergaard K, Yang B, Cross D, Millward B,
Demaine A, Aldose reductase expression is induced by hyperglycemia in

diabetic nephropathy, *Kidney International*, 2001; 60: 211-8)。已经表明 ALR2 基因 5'-(CA) 的 z-2 等位基因、C-106T 多态性 T 等位基因使包括中国血统患者在内的 I, II 型糖尿病患者患肾病的危险性增加(Wang Y, Ng M, Lee S, So W, Tong C, Cockram C, et al, Phenotypic heterogeneity associations of two aldose reductase gene polymorphisms with nephropathy and retinopathy in Type 2 diabetes, *Diabetes Care*, 2003; 26: 2410-5)。上述公开的遗传因子进一步地与代谢的、血液动力学的和生长因子作用, 致使肾功能蛋白尿和逐渐衰竭(Parving H. H, Tarnow L, Rossing P, Genetics of diabetic nephropathy, *Journal of American Society of Nephrology*, 1996; 7: 2509-17)。

尽管已经有关于这 5 个遗传标记与白种人和日本人糖尿病并发症的关系的报道, 但对于中国血统糖尿病患者群还没有相一致的报道。到目前为止, 还没有报道表明这些遗传因子对糖尿病并发症, 包括糖尿病肾病的形成产生交互作用效应。

应用基因组学的前景在于它的潜在用途, 它可以用来鉴别危险性患者以期较早地和有目地干预, 从而确保身体健康和减少诸如糖尿病之类致死性疾病的影响(Collins F, Green E, Guttmacher A, Guyer MobotuNHGRI, A vision for the future of genomics research. A blueprint for the genomic era, *Nature*, 2003; 422: 835-47)。在鉴定中国糖尿病患者并发症高危患者的遗传因子的研究中, 我们第一个报道 AGT TT 基因型与糖尿病有关以及其与 ACE D 等位基因一起对糖尿病的形成产生协同作用(Young RP, Chan J. C. N, Poon E, Critchley J. A. J. H, Cockram C. S, Associations between albuminuria and angiotensinogen T235 and angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphisms in Chinese NIDDM patients, *Diabetes Care*, 1997; 21: 431-7)。同样, 我们第一个报道了 ALR2 TT 基因型与中国血统患者患糖尿病患肾病的危险性有关(Wang Y, Ng M, Lee S, So W, Tong C, Cockram C, et al, Phenotypic heterogeneity associations of two aldose reductase gene polymorphisms with nephropathy and retinopathy in Type 2 diabetes, *Diabetes Care*, 2003; 26: 2410-5)。

发明概要

因此，本发明涉及到一种检测中国血统糖尿病患者已患有、将可能发展成、或者疑似患有肾病的方法，该方法包括如下步骤：

5 检测来自糖尿病患者的样品中是否含有下列多态性序列中的至少一种：ACE 基因的 I/D 基因型，AGT 基因的 M235T 基因型，ALR2 基因的 (CA)_n-5'(z-2) 基因型，ALR2 基因启动子区的 C106T 基因型，TNF- α 基因的 G-308A 基因型，以及其互补序列，条件是不单独使用 ALR2 的基因型，其中多态性序列的存在表明该糖尿病患者已患有、将有可能发展成、或者疑似患有肾病。

10 在本发明的一个实施方案中，上述方法还包括从患者中取样的步骤。该患者优选患有 II 型糖尿病，取得的样品优选为血液。

本发明还涉及到用来检测中国血统糖尿病患者已患有、将可能发展成、或者疑似患有肾病的芯片，该芯片包括下列多态性序列中的至少一种：ACE 基因的 I/D 基因型，AGT 基因的 M235T 基因型，ALR2 基因的 (CA)_n-5'(z-2) 基因型，ALR2 基因启动子区的 C106T 基因型，TNF- α 基因的 G-308A 基因型，以及其互补序列，条件是不单独使用 ALR2 的基因型。

在本发明中，I/D 多态性优选含有 DD 基因型，G-308A 多态性优选含有 GG 基因型。

本发明还涉及到用于检测中国血统糖尿病患者已患有、将有可能发展成、或者疑似患有肾病的试剂盒。试剂盒一般包括本发明所定义的芯片和指导用此芯片处理样品的指导性材料。优选地，该试剂盒含有从患者中采取样品的装置。

附图的简要说明

25 图 1 显示了 711 例具有不同数目危险基因型的中国血统 II 型糖尿病患者患肾病的几率，这些基因型包括 AGT 基因的 TT 基因型，ACE 基因的 DD/DI 基因型，TNF- α 基因的 GG 基因型，AGT 基因的 TT 基因型，ALR2 基因的 x/z-2 o 或 z-2/z-2 基因型，ALR2 基因的 CT/TT 基因型。

图 2 显示了 947 例中国血统 II 型糖尿病患者中 ACE 基因 I/D 基因型携带者发生肾病终点事件的 Kaplan-Meier 曲线图。

图 3 显示了患者初级复合终点事件(图 3A)或晚期肾病终点事件(图 3B)和全致死(图 3C)的 Kaplan-Meier 曲线图。依托多学科团队，按照注重对目标实施定期监控、治疗和增强患者依从性的方案(干扰组)与基于通常的临床护理的方案(对照组)处理上述患者，其中干扰组的患者一直在医生的指导下治疗，而对照组的患者依从性不稳定。

发明的详细描述

遗传学、流行病学与试验研究支持了这样一种主张：糖尿病肾病涉及多种生物化学途径(Cooper M, Pathogenesis, prevention and treatment of diabetic nephropathy, *Lancet*, 1998; 352: 213-9)。基于国际和地区的、
10 临床与实验的证据，我们认为 AGT 基因 M235T 的 TT 基因型，ACE 基因 I/D 的 DD/ID 基因型，TNF- α 基因 G-308A 的 GG 基因型，ALR2 基因 x/z-2 或 z-2/z-2(z = z-2 之外的任何等位基因)和 CT/TT 基因型都是中国血统糖尿病患者患肾病的潜在危险基因型。

15

定义

除非在发明中特别指出，术语“AGT 基因 M235T”或“AGT M235T”是指“AGT 基因的 M235T 基因型”；术语“ACE 基因 I/D”或者“ACE I/D 多态性”与“ACE 基因的 I/D 基因”含意相同；术语“TNF- α 基因 GG”等同于“TNF- α 基因 G-308A 的 GG 基因型”；术语“TNF- α 基因 G-308A”或“TNF- α 基因启动子区域的 G-308A 多态性”或“TNF- α G-308A”或“TNF α G308A 多态性”是指“TNF- α 基因的 G-308A 遗传型”；术语“醛糖还原酶 5’-(CA)n 的 z-2 等位基因”或者“ALR2 (CA)n-5’(z-2)”等同于“ALR2 基因 5’-(CA)重复序列的(z-2)基因型”；术语“醛糖还原酶(ALR2)的 C-106T 多态性的 T 等位基因”等同于“ALR2 TT 基因型，ALR2 基因 TT”或者“ALR2 基因 CT/TT 基因型”；术语“一个 ALR2 的 C-106T 多态性”是指“启动子区域的 ALR2 基因的一个 C-106 基因型”。

本发明用来检测中国血统糖尿病患者已患有、将有可能发展成、或者疑似患有肾病的方法包括如下步骤：检测来自糖尿病患者的样品中是否含有下列多态性序列中的至少一种：ACE 基因的 I/D 基因型，AGT 基

因的 M235T 基因型， ALR2 基因的(CA)n-5'(z-2)基因型， ALR2 基因启动子区的 C106T 基因型， TNF- α 基因的 G-308A 基因型，以及其互补序列，条件是不单独使用 ALR2 的基因型，其中多态性序列的存在表明该糖尿病患者已患有、将有可能发展成、或者疑似患有肾病。

5 在上述方法中用作遗传标记的多态性可以通过以下步骤予以鉴别：

(a) 从患者中提取基因组 DNA

(b) 以基因组 DNA 为模板用 PCR 方法扩增基因组 DNA 中的 ACE 基因， AGT， TNF- α G-308A 多态性基因，醛糖还原酶(ALR2)CA 重复序列， ALR2 基因的 C106T 启动子；和

10 (c) 应用凝胶分离或测序鉴别 (b) 步骤中的产物。

在本发明中，基因组 DNA 可以从患者的体液中抽提，如血液和尿液，优选为血液。

尽管本发明的检测方法可以应用于任何一糖尿病患者，但是该方法优先用于 II 型糖尿病患者。中国血统糖尿病患者特别适合于本发明。

15 本研究的四个候选基因均可通过可能的代谢途径引起糖尿病肾病的形成。AGT 与 ACE 是导致高血压和组织异常生长的 RAS 的重要组成元件 (Cooper M, Pathogenesis, prevention and treatment of diabetic nephropathy, *Lancet*, 1998; 352: 213-9; Ringel J, Beige J, Kunz R, Distler A, Sharma A, Genetic variants of the renin angiotensin system, 20 20 diabetic nephropathy and hypertension, *Diabetologia*, 1997; 40: 193-9). 细胞因子 TNF- α 使肥胖症与胰岛素抗性间产生关联(Hotamisligil GS, Spiegelman BM, Tumor necrosis factor : a key component of the obesity-diabetes link, *Diabetes*, 1994; 43: 1271-8), 有报道表明其血清水平确定地与糖尿病肾病相关 (Moriwaki Y, Yamamoto T, Shibutani Y, 25 Aoki E, Tsutsumi Z, Takahashi S, et al, Elevated levels of interleukin 18 and tumor necrosis factor alpha in serum of patients with type 2 diabetes mellitus: relationship with diabetic nephropathy, *Metabolism: Clinical and Experimental*, 2003; 52: 605-8)。通过山梨醇酯的细胞间积累和高血糖条件下的氧化压力增加，ALR2 引起微血管疾病的发生(Chung S, Ho E, 30 Lam K, Chung S, Contribution of polyol pathway to diabetes-induced

16

oxidative stress, *Journal of American Society of Nephrology*, 2003; 14: S233-6).

在中国血统人群中这些基因型的发现是基于一系列横向的、预期的和病例对照研究，结果与糖尿病肾病患者的表型特征一致，其中的糖尿病肾病患者比未患糖尿病肾病的患者更肥胖、血压更高，具有更多不良的脂和血糖调控。大规模随机临床研究已经证实抑制 RASD，加强血糖和血压调控对治疗糖尿病蛋白尿病和 ESRD 形成具有有益效果(Brenner B. M, Cooper M. E, De Zeeuw D, Keane W. F, Mitch W. E, Parving H. H 等, Effects of Losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy, *New England Journal of Medicine*, 2001; 345: 861-9; UKPDS, Intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33), *Lancet*, 1998; 352: 837-53; Adler A. I, Stratton I. M, Neil H. A, Yudkin J. S, Matthews D. R, Cull C. A 等, Association of systolic blood pressure with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 36): prospective observational study, *British Medical Journal*, 2000; 321: 412-9)。最近的研究表明，组合使用 ACE、ALR2 抑制剂治疗能产生协同作用从而改善糖尿病大鼠的神经功能(Cotter M, Mirrlees D, Cameron N, Neurovascular interactions between aldose reductase and angiotensin converting enzyme inhibition in diabetic rats, *European Journal of Pharmacology*, 2001; 417: 223-30)。总之，对这些遗传因子及其交互作用的鉴定（和提高对同一患者危险基因型的同时筛选效率的相关微芯片技术）可筛选出高危个体以对其进行强化与有目的治疗从而减少并发症危险。关于这一点，依赖多学科团队，我们已经证实注重对目标实施定期监控、治疗和增强患者的依从性的多重方法可以使中国血统糖尿患者死亡和患晚期肾病 (ESRD) 的危险减少 40-70%。(图 3)。由于携带这些基因型的患者的危险性不断地增加，该疾病调控方案及其花费有效性的优点应该还会得到进一步的提高。

在对年龄与性别进行调整后，我们发现患肾病的危险性随着危险基

因型数目的增加而渐进式地显著增加。携带有 3 种或者更多危险基因型的患者占总患者的 66%，与携带有 0 种或者 1 种危险基因型的那些患者相比，这些患者患糖尿病肾病的危险性增加了 1.8-2.0 倍。

我们提供了原始数据证实了 DD 基因型对 ESRD 形成、TNF- α 对糖尿病肾病，特别是对肥胖性糖尿病患者的糖尿病肾病的前兆性作用。更重要的是这些数据证实了这 5 种基因型间的交互作用对糖尿病肾病形成具有前兆性作用。

能够理解以上所提到的一种或者多种基因型可以用于制备芯片，该芯片可以与其它已知的临床的、生物化学的与遗传学的芯片一起用来预测中国血统糖尿病患者中糖尿病并发症，包括肾病发生的危险性。这些基因型或其等效芯片可以用于检测患者患糖尿病和/或糖尿病肾病的危险性，从而使用包括强度监测、药理学与非药理学疗法在内的多重方法来改变危险性。

为了实施本发明，使用本发明定义的芯片作为试剂盒来检测中国血统糖尿病患者已患有、将有可能发展或疑似患有肾病是方便的。该试剂盒包括上述芯片和扩增基因 ACE、AGT、ALR2 或 TNF- α 的一对引物。在本发明试剂盒的一个实施方案中，该引物选自从 SEQ ID NO: 1 到 SEQ ID NO: 10。

此发明还提供了含有一种芯片的试剂盒，该芯片含有下列多态性序列中的至少一种和根据该序列设计的作为对照的任意探针：ACE 基因的 I/D 基因型，AGT 基因的 M235T 基因型，ALR2 基因的 (CA)_n-5'(z-2) 基因型，ALR2 基因启动子区的 C106T 基因型，TNF- α 基因的 G-308A 基因型，以及其互补序列。

本发明将通过以下实施例作进一步的描述。

25

实施例 1

五个多态性序列基因型的鉴定

人类基因组的制备

从每个患者中收集大约 10ml EDTA 血样，用 SDS 和蛋白酶 K 过夜裂解细胞后，用苯和氯仿抽提得到基因组 DNA。然后将 DNA 颗粒溶解到

1X TE 缓冲液中。通过检测 260nm 和 280nm 处的光密度测定抽提的 DNA 数量和质量。将抽提的 DNA 在 4°C 下贮藏以备下次基因型分析。

ACE 基因的 PCR 条件

5 反应依据改进的 Rigat 的方法进行(Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F, An insertion deletion polymorphism in angiotensin I converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels, *Journal of Clinical Investigation*, 1990; 86: 1343-1346)。使用 GeneAmp PCR System 9700(ABI)在标准 PCR 缓冲液
10 (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 3mM MgCl₂, dNTP 各 0.2mM)(ABI) 中扩增 150ng DNA 模板，引物浓度为各 5pmol，Taq 聚合酶为 0.6U(Amersham)，总体积为 20μl。循环条件如下：开始在 94°C 下变性 2min, 94°C 1min, 58°C 1min, 72°C 2min, 共 30 个循环，最后在 72°C 下延伸 5min。引物的序列如下：

15 5'CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT 3' SEQ ID NO. 1
5' GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T 3' SEQ ID NO. 2

PCR 产物是 190bp 和 490bp 的片断，前者不含有插入等位(insertion allele)基因，后者含有插入等位基因。

血管紧张素基因的 PCR 条件

反应依照 Russ 的方法进行 (Russ A, Maerz W, Ruzicka V, Stein U, Gross W, Rapid detection of the hypertension associated Met235→Thr allele of the human angiotensinogen gene, *Human Molecular Genetics*, 1994; 2: 609-10)。使用 GeneAmp PCR System 9700(ABI)在标准 PCR 缓冲液(50mM
25 KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.3,, 1.5mM MgCl₂, dNTP 各 50uM)(ABI)中扩增 200ng DNA 模板，引物浓度为各 0.3uM，Taq 聚合酶为 0.75U(Amersham)。引物的序列如下：

30 5'-CAG GGT GCT GTC CAC ACT GGA CCC C-3' SEQ ID NO. 3
5'-CCG TTT GTG CAG GGC CTG GCT CTC T-3' SEQ ID NO. 4

循环条件如下：90°C 变性 3min; 94°C 1 min 68°C 1min., 72°C 1min..

10 个循环；之后为 90°C 30sec, 68°C 1min., 72°C 30sec., 30 个循环，最后 72°C 延伸 10min.

PCR 产物用 5UTth 111 I(Promega)酶在 65°C 消化过夜。消化片段在 3% 的琼脂糖凝胶中通过电泳进行分离。纯的蛋氨酸等位基因表现为未消化的 165bp 单带带型，苏氨酸呈现为 141bp 与 24bp 带型。
5

TNF- α G-308A 多态性的 PCR 条件

依据 Wilson 等描述的方法进行反应(Wilson A, di Giovine F, Blakemore A, Duff G, Single base polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha gene detectable by NcoI restriction of PCR product, *Human Molecular Genetics*, 1992; 1: 535)。使用 GeneAmp PCR System 9700 (ABI) 进行反应，终体积为 20 μ l，包含 100ng DNA 模板，50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 2.5mM MgCl₂, 0.2mM 每种 dNTP (Boehringer-Mannheim, Germany)。引物浓度为各 0.5mM，Taq 聚合酶为 0.05U(Boehringer-Mannheim, Germany)。引物的序列如下：
10
15

5'-AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3' SEQ ID NO. 5

5'-TCC TCC CTG CTG CTC CGA TTC CG-3' SEQ ID NO. 6

循环条件如下：开始在 95°C 变性 3min, 95°C 1min, 58°C 1 min, 72°C 1min, 共 35 个循环。最后在 72°C 延伸 10min。PCR 扩增产物用 10U NcoI 酶(Promega)在 37°C 消化过夜。消化片段在 3% 的琼脂糖凝胶中通过电泳进行分离。A 等位基因表现为未消化的 165bp 带型，G 等位基因呈现为 87bp 与 20bp 带型。
20

醛糖还原酶(ALR2)CA 重复序列 PCR 条件

含有二核苷酸 CA 重复序列的区域通过用 Ko 等所描述的 PCR 方法 (Ko B. C. B, Lam K. S. L, Wat N. M. S, Chung S. S. M, An (A-C)_n dinucleotide repeat polymorphic marker at the 5' end of the aldose reductase gene is associated with early onset diabetic retinopathy in NIDDM patients, *Diabetes*, 1995; 44: 727-32) 进行扩增，所使用的引物侧翼与 138bp 的区
25
30

反应所用的有义链的序列是：

5'-GAA TCT TAA CAT GCT CTG AAC C-3'

SEQ ID NO. 7

反义链序列是：

Arpr2 5'-GCC CAG CCC TAT ACC TAG T-3'.

SEQ ID NO. 8

5 将 1 个 M13 尾(5'-CAC GAC GTT GTA AAA CGA C-3')加到有意义链
引物 5'末端用来标记红外荧光

10 PCR 在按照提供的配方制备的缓冲液中进行，总体积为 4 μ l，包含
1ng DNA 模板，2.5mM MgCl₂，dNTP 各 0.2mM，引物各 0.1pmol/ μ l，
0.15pmol/ μ l IRD800 标记的 M13 正向(-29)引物，0.15U Taq 聚合酶
15 (AmpliTaq, Perkin-Elmer/Cetus, Norwalk, CT)。循环条件为：初始 94°C
变性 3min, 94°C 1min., 57°C 1min, 72°C 1min, 共 35 个循环，最后 72°C
延伸 10min。

15 扩增出的 PCR 产物在 95°C 加热 5min，然后上样到 5.5% 的聚丙烯酰
胺凝胶上，在 0.8X TBE 电泳液中用 Li-COR DNA Analyser (Li-COR,
Lincoln, NE) 电泳分离，功率恒定为 75W，温度为 55°C。通过与携带有
ALR2 基因的 23(CA) 重复序列比较的得到等位基因的大小，其中的 ALR2
基因的 23(CA) 重复序列由 Shiga University of Medical Science of Japan 的
Dr. Shiro Maeda 赠送。

20 ALR2 基因 C106T 启动子的 PCR 条件

反应依据 Kao YL 等描述的方法进行(Kao Y, Donaghue K, Chan A, Knight J, Silink M, A novel polymorphism in the aldose reductase gene promoter region is strongly associated with diabetic retinopathy in adolescents with type 1 diabetes, *Diabetes*, 1999; 48: 1338-40)。使用
25 GeneAmp PCR System 9700 (ABI) 进行反应，最终体积为 20 μ l，包含 100ng
DNA 模板，50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.3, 2mM MgCl₂, dNTP 各
0.2mM (Boehringer-Mannheim, Germany)。引物浓度为各 0.5pmol/ μ l，Taq
聚合酶为 0.5U (Boehringer-Mannheim, Germany)。引物的序列如下：

30 5'-CCT TTC TGC CAC GCG GGG CGC GGG-3'

SEQ ID NO. 9

5'-CAT GGC TGC TGC GCT CCC CAG-3'

SEQ ID NO. 10

循环条件如下：初始 94°C 变性 3min., 94°C 1min., 57°C 1min., 72°C 1min，共 35 个循环，最后 72°C 延伸 10min。PCR 扩增产物用 5U BfaI(New England Biolabs, Beverly, MA) 酶在 37°C 消化过夜。消化片段在 3.5% 的琼脂糖凝胶中通过电泳进行分离。C 等位基因表现为 206bp 与 57bp 的片段，206bp 片段进一步切割成 147bp 与 59bp 片段而得到 T 等位基因。

实施例 2

肾病与基因间交互作用的关系

我们检测了 711 例(303 男，408 女，年龄 63.1 ± 11.1 岁)中国血统 II 型糖尿病患者的 AGT 基因 M235T, ACE(I/D), TNF- α 基因 G-308A, ALR2 基因 5'-CA_n 和启动子 C-106T 多态性的交互作用情况。选择有超过十年糖尿病病史，血浆肌氨酸酐小于 100 $\mu\text{mol}/\text{l}$ 以及即时尿清蛋白肌氨酸酐比率(spot urine albumi creatinine ratio) (ACR) 小于 3.5mg/mmol 的患者作为对照(n=388)。血浆肌氨酸酐大于 150 $\mu\text{mol}/\text{l}$ 或者 ACR 不小于 25mg/mmol 的患者认为患有肾病(n=323)。将包括甘油三酸酯、ACR 在内的不规则数据进行对数转换，用社会学统计包(Version 10.0, SPSS Inc, Chicago) 进行统计学分析。如果合适，连续变量用平均值 \pm SD 或者几何学平均值(\times/\div 反对数) SD 表示。应用 Independence Sample T-测试与共变异数分析进行群体间的比较分析。用卡方测定来分析等位基因与基因型频率以及不同类型糖尿病患者相关的代谢异常与并发症的百分率。计算置信区间(CI) 为 95% 的具有不同数目危险基因型的患者可能患糖尿病肾病的几率(OR)，P 值小于 0.05(2-尾) 可认为几率很大。患有肾病的患者与未患肾病的患者相比，年纪大的男性居多。校正年龄和性别后，患有肾病的患者比未患肾病的患者更肥胖和有更高的体重指数(BMI)、腰-臀比(WHR) 和更高的血压。他们还具有更不良的脂肪分布，更高的血清总胆固醇(TC)、甘油三酸酯(TG)，更低的 HDL-C 和更容易患感官神经疾病、视网膜病，周边血管病变、心血管疾病。表 1 显示了 711 例中国血统 II 型糖尿病患者中患肾病者与未患肾病的临床与生物化学参数比较。数据表示为平均值 \pm SD 或者几何平均值(\times/\div 反对数) SD，患肾病的患者和未患肾病的患者的数据用 Independent Sample T - 测试值进行比较，两研究组的糖尿病

并发症的百分率用卡方测定值比较。

表 1

	研究组		P 值	校正后
	未患肾病	患肾病		的 P 值
	(N=323)	(N=388)		
性别(%男性)	30.0	53.1	<0.001	-
年龄(年)	60.6±10.1	65.1±11.6	<0.001	-
糖尿病发病时间(年)	16.0±1.6	8.2±5.4	<0.001	-
体重指数(kg/m ²)	23.9±3.2	25.5±4.0	<0.001	<0.001
腰高比	0.87±0.06	0.91±0.07	<0.001	<0.001
收缩压(mmHg)	131±18	153±23	<0.001	<0.001
舒张压(mmHg)	72±10	83±12	<0.001	<0.001
糖化血红蛋白(%)	7.6±1.3	8.1±2.1	<0.001	<0.001
禁食血浆葡萄糖(mmol/l)	8.3±2.8	9.5±4.4	<0.001	<0.001
总胆固醇(mmol/l)	5.2±1.0	5.9±1.5	<0.001	<0.001
甘油三酸酯(mmol/l) ^a	1.1×/÷1.7	1.9×/÷1.9	<0.001	<0.001
高密度脂蛋白-C (mmol/l)	1.4±0.4	1.2±0.3	<0.001	<0.001
低密度脂蛋白-C (mmol/l)	3.20±0.84	3.73±1.21	<0.001	<0.001
血浆肌氨酸酐(μmol/l)	72.4±14.3	152.6±105.4	<0.001	<0.001
清蛋白肌氨酸酐比率(mg/mmol) ^a	1.1×/÷2.0	128.8×/÷2.9	<0.001	<0.001
肥胖(%)	34.5	47.9	<0.001	<0.001
高血压 (%)	46.7	81.2	<0.001	<0.001
血脂异常(%)	52.0	83.0	<0.001	<0.001
视网膜病(%)	25.1	54.6	<0.001	<0.001
神经病(%)	18.6	43.8	<0.001	<0.001
周边血管病变(%)	2.8	13.4	<0.001	<0.001
缺血性心脏病(%)	5.9	12.4	0.003	0.019
脑血管疾病(%)	3.7	8.5	0.009	0.098
RAS 抑制剂的应用(%)	26.9	79.9	<0.001	-

*校正年龄与性别后，应用共变异数分析得到的 P 值

表 2 总结了这 5 种类型基因型在患有或未患有肾病的患者中的分布情况。通过卡方测定对患有或未患有肾病的患者的基因型或者等位基因频率进行比较，患肾病的患者比未患肾病的患者具有更高频率的 ALR2 基因 5'-(CA)_n 的 z-2(24.1% vs. 18.6%, P=0.01) 和 ALR2 基因 C-106T 的 T 等位基因(25.8% vs. 21.4%, P=0.05)。ALR2 5'-(CA)_n z-2 等位基因携带者比非 z-2 等位基因携带者具有更高的 ACR 水平($17.8 \times / 12.3$ vs. $12.6 \times / 12.9$ mg/mmol, P=0.062)和视网膜病百分率(47.4% vs. 37.4%, P=0.009)。ACE I/D 的 DD/DI 基因型携带者比 II 基因型携带者具有更高水平的 TC 水平(5.7 ± 1.4 vs 5.5 ± 1.3 mmol/l, P=0.047)。在对年龄与性别进行校正后，TNF- α 基因 G-308A 的肥胖性 GG 基因型携带者比非肥胖性患者具有更高水平的 ACR($22.9 \times / 11.5$ vs $10.7 \times / 13.2$ mg/mmol, P<0.001) 和血浆肌氨酸酐水平(125 ± 95 vs. 108 ± 75 μ mol/l, P=0.005)

15 表 2

基因多态性的基因型	基因型频率(%)		基因多态性的等位基因	等位基因频率(%)	
	未患肾病 (N=323)	患肾病 (N=388)		未患肾病 (N=646)	患肾病 (N=776)
AGT 基因			AGT 基因		
M235T			M235T		
TT	70.9	72.9	T	84.4	85.7
TM	26.9	25.5			
MM	2.2	1.5	M	15.6	14.3
ACE 基因 I/D			ACE 基因 I/D		
II	45.8	46.4	I	66.6	67.3
DI	41.5	41.8			
DD	12.7	11.9	D	33.4	32.7
TNF- α 基因			TNF- α 基因		

G-308A		G-308A			
GG	80.8	84.0	G	89.9	91.8
GA	18.3	15.5			
AA	0.9	0.5	A	10.1	8.2
ALR2 基因		ALR2 基因			
$5'-(CA)_n$		$5'-(CA)_n$			
x/x	67.2	57.7	x	81.4	75.9
x/z-2	28.5	36.3			
z-2/z-2	4.3	5.9*	z-2	18.6	24.1+
ALR2 基因		ALR2 基因			
$5'-(CA)_n$		$5'-(CA)_n$			
y/y	89.9	93.3	y	94.4	96.6
y/z+6	9.3	6.7			
z+6/z+6	0.9	0**	z+6	5.6	3.4++
ALR2 基因		ALR2 基因			
C-106T		C-106T			
CC	63.5	56.7	C	78.6	74.2
CT	30.3	35.1			
TT	6.2	8.2***	T	21.4	25.8+++

x=除了 z-2 等位基因以外的任何(CA)_n 等位基因;

y=除了 z+6 等位基因以外的任何(CA)_n 等位基因;

*P=0.01, **P=0.09, ***P=0.07, 当分别比较肾病患者与非肾病患者 ALR2 基因 x/z-2 或 z-2/z-2, y/z+6 或 z+6/z+6 与 CT/TT 的组合基因型频率时;

5 +P=0.01, ++P=0.04, +++P=0.05, , 当当分别比较肾病患者与非肾病患者 ALR2 基因 z-2, z+6 与 T 等位基因频率时.

表 3 总结了患者群中基因型数目的分布。在 711 个中国血统 II 型糖尿病患者中, 64(9.0%)有 0 或 1 个危险基因型, 176(24.8%)有 2 个危险基因型, 290(40.8%)有 3 个危险基因型, 181(25.5%)有 4 或 5 个危险基因型。与不多于 1 个危险基因型的患者相比, 有 2、3 和大于 4 个危险基因型

(趋势值 $P=0.006$)的患者患肾病的几率分别从 1.4 (95% CI 0.8-2.4, $P=0.3$) 增加到 1.8(95% CI 1.1-1.3, $P=0.03$)和 2.0 (95% CI 1.1-3.6, $P=0.02$)(图 2)。

表 3

危险基因型的数目	未患肾病	患肾病	总群 N (%)
0 危险基因型	6	2	8(1.1)
1 危险基因型	31	25	56(7.9)
2 危险基因型	88	88	176(24.8)
3 危险基因型	125	165	290(40.8)
4 危险基因型	58	87	145(20.4)
5 危险基因型	15	21	36(5.1)
总计	323	388	711

5

实施例 3

TNF- α GG 基因型与肾病的关系

表 4 显示了在中国血统 II 型糖尿病患者中 TNF- α 基因的 G-308A 多态性与肥胖间的交互作用对肾病形成的影响，其中“Ref”代表参考组，该 10 组是非肥胖 GA/AA 携带者。拥有 GG 基因型的肥胖患者患肾病的危险性升高了 1.9 倍(95% CI: 1.1-3.2, $P=0.012$)。

表 4

组	频率数. (%)		糖尿病肾病的危险性		
	未患肾病	患肾病	OR	95% CI	P 值
GG-/非肥胖 (Ref.)	40(12.4)	38(9.8)	1		
GG-/肥胖	22(6.8)	24(6.2)	1.2	0.55-2.38	0.710
GG+/非肥胖	172(53.1)	164(42.3)	1.0	0.62-1.65	0.970
GG+/肥胖	89(27.6)	162(41.8)	1.9	1.15-3.20	0.012

表 5 显示了在校正干扰因素如年龄、性别、微血管血糖、高血压、高血脂、视网膜病、神经病与周边血管病变后用来检测 TNF- α 基因 G-308A 与肥胖间的交互作用对肾病的影响的多元逻辑斯蒂回归分析。在表 5 中，校正的总百分率为 75.2%，依变量：肾病的 code=1；自变量包括年龄、性别（男性的 code=1）、HbA1c、FPG 和存在的高血糖、高血压及视网膜病、神经病与周边血管病变、缺血性心脏病与脑血管疾病 (code=1)。肥胖与 TNF- α 基因 G-308A 多态性间的交互作用为：GG-/肥胖-(code=0)，GG-/肥胖+ (code=1)，GG+/肥胖- (code=2)，GG+/肥胖+ (code=3)。

10

表 5

独立预测因子	患糖尿病肾病的危险性		
	几率	95% CI	P 值
年龄 (年)	1.02	1.002-1.04	0.033
雄性	2.6	1.78-3.71	<0.001
禁食血浆葡萄糖 (mmol/l)	1.1	1.03-1.16	0.002
高血脂	2.8	1.86-4.18	<0.001
高血压	3.2	2.19-4.81	<0.001
视网膜病	2.4	1.62-3.51	<0.001
神经病	2.1	1.36-3.22	0.001
周边血管病变	2.8	1.21-6.59	0.017
GG-/肥胖+ vs GG-/肥胖-	1.4	0.57-3.26	0.482
GG+/肥胖- vs GG-/肥胖-	1.2	0.64-2.15	0.614

实施例 4ACE II/DD 基因型与糖尿病肾病的关系

在病史平均为 4.0 ± 1.4 年的 947 名中国血统糖尿病患者的扩增组中，我们检测了 ACE II/DD 基因型对定义为肾脏死亡的 ESRD 或肾脏事件(需要透析或血浆肌氨酸酐 $>500 \mu\text{mol/l}$ 或血浆肌氨酸酐基准值的两倍 $>150 \mu\text{mol/l}$)形成的影响。在 947 名患者中，62 名患者发生了肾脏终点事件。

表 6 显示了在 947 名中国糖尿病患者中的 ACE I/D 多态性基因型和等位基因的频率，这些患者有或没有发生肾脏终点事件，此终点事件定义为血浆肌氨酸酐基准值的两倍或者在 4.0 年的平均期限后仍需要肾透析。我们应用卡方对发生和未发生肾病终点事件的基因型和等位基因频率进行了比较。

从表 6 可以看出，前一组患者比没有发生肾病终点事件的患者具有更高的 DD 基因型(19.4% vs. 9.8%, P=0.031)和 D 等位基因频率(41.2% vs. 30.2%, P=0.011)。Kaplan-Meier 分析表明了在携带 II (460 中 23 个患者发生肾脏终点事件), DI (388 中 27 个患者演化出肾脏终点事件), DD (99 中 12 个患者发生肾脏终点事件)基因型的患者中累积性肾脏存活率(cumulative renal survival rate)有明显的不同。(log-rank P=0.019)(图 2)。

表 6

	肾病终点事件的发生状况	
	非发生率	发生率
基因型频率(%)		
II	49.4	37.1
DI	40.8	43.5
DD	9.8	19.4†
基因型数目	885	62
等位基因频率(%)		
I	69.8	58.8
D	30.2	41.2‡
等位基因总数	1771	124

† P = 0.031, ‡ P value = 0.011 当分别在发生和没有发生肾病终点事件的患者间进行基因型和等位基因频率比较时。

表 7 显示了用来检测 947 名中国血统 II 型糖尿病患者中的肾脏终点事件的前兆因子的多元 Cox-回归分析，在其中，“a”代表在初始时出现微量或巨量蛋白尿的患者；“b”代表与 II 基因型携带者相应的 DI 基因型携

带者，“c”代表与 II 基因型携带者相应的 DD 基因型携带者。依变量包括：肾脏死亡或肾脏事件(code=1)；自变量包括：年龄，性别(对男性，code=1)，糖尿病发病时间，SBP，DBP，TC，TG、HDL-C、LDL-C 的对数值，并发症的出现(code=1)，如在基线处出现的肾病、视网膜病、神经病与周边血管病变，以及 ACE 基因 I/D 多态性(对于 DI, code=1 vs. II, 对于 DD, code=2 vs. II)。

在多元 Cox-回归分析中，肾病终点事件的出现一直显著地受到 I/D 多态性的影响，该 I/D 基因型含有一个具有明显有害效果的 DD 基因型 (DD vs. II, 校正的危险比率为 3.4, 95% CI 1.6-7.3, P=0.002)。其它独立的前兆因子包括长期患糖尿病、高收缩血压、甘油三酸酯、在初始时发生肾病和视网膜病。

表 7

独立变量(基线值)	β 相关系数	危险比率*	95% CI	P 值
糖尿病发病时间(年)	0.050	1.05	1.01-1.09	0.013
血收缩压(mmHg)	0.014	1.01	1.00-1.03	0.012
甘油三酸酯对数值(mmol/l)	2.063	7.87	2.24-27.7	0.001
糖尿病肾病的出现 ^a	3.579	35.8	4.84-265.	<0.001
		2		
视网膜病的出现	0.850	2.34	1.27-4.30	0.006
ACE 基因 I/D ^b DI 基因型携带者	0.595	1.81	0.99-3.31	0.053
基因 I/D ^c DD 基因型携带者基因	1.223	3.40	1.59-7.27	0.002
I/D ^c				

15

实施例 5

ALR2 的基因型与糖尿病肾病的关系

在有 738 个中国血统 II 型糖尿病患者的另一组中[年龄 55.5 ± 13 岁，确诊病史为 5.7 ± 5.7 年，平均值 $\pm SD$]，仅有 21.5% 患肾病(DN)，仅有 8% 患有视网膜病(DR)，53.1% 未患并发症(UC)。CT/TT 基因型携带者(N=267)

的尿 AER 比 CC 基因型携带者高。($N=471$) $(30.2 \times / \div 7.2$ vs. $21.9 \times / \div 6.9 \mu\text{g}/\text{min}$, $P=0.03$)。在校正干扰变量, 如年龄、糖尿病持续时间、血压和血红蛋白 A1c 后, 该差异还是很明显($P=0.04$)。

因为疾病的持续期是糖尿病微血管并发症的主要决定因素 (Rogus J. J., Warram J. H, Krolewski A. S, Genetic studies of late diabetic complications. The overlooked importance of diabetes duration before complication onset, *Diabetes*, 2002; 51: 1655-1662), 因此患糖尿病时间不足 5 年的患者($n=300$)在接下来的分析中被排除, 将剩余的患者($n=438$)分成四个亚组: 159 名患者(36.3%)仅具有 DN, 66 名患者(15.1%)仅具有 DR, 121 名患者(27.6%)具有 DN 和 DR, 92 名患者(21%)没有并发症。单变量分析表明相对于 UC 组, DN 和 DR 组的 z-2 等位基因(25.7% vs. 16.9%, OR 1.7, 95% CI 1.0-2.8, $P=0.03$)、T 等位基因(26.4% vs. 18.5%, OR 1.6, 95% CI 1.0-2.7, $P=0.04$)的频率较高。

采用年龄、性别、疾病发病时间、BP、代谢指数和三个 ALR2 的基因型(携带的 z+6, 携带的 z-2 和携带的 CT/TT)作为自变量, UC 组作为对照(code=0), 携带的 z-2 (OR 2.64, 95% CI 1.02-5.83)和 CT/TT 基因型(OR 2.48, 95% CI 1.19-5.19)以及年龄(OR 1.06, 95% CI 1.02-1.10), BP (OR 1.04, 95% CI 1.02-1.06), HbA1c (OR 1.23, 95% CI 1.03-1.46), log TG (OR 20.1, 95% CI 3.73-107.7)和雄性(OR 2.25, 95% CI 1.10-4.61)都是预测 DN、DR 的独立的危险因子, 该预测正确率达 76.9%。

说 明 书 附 图

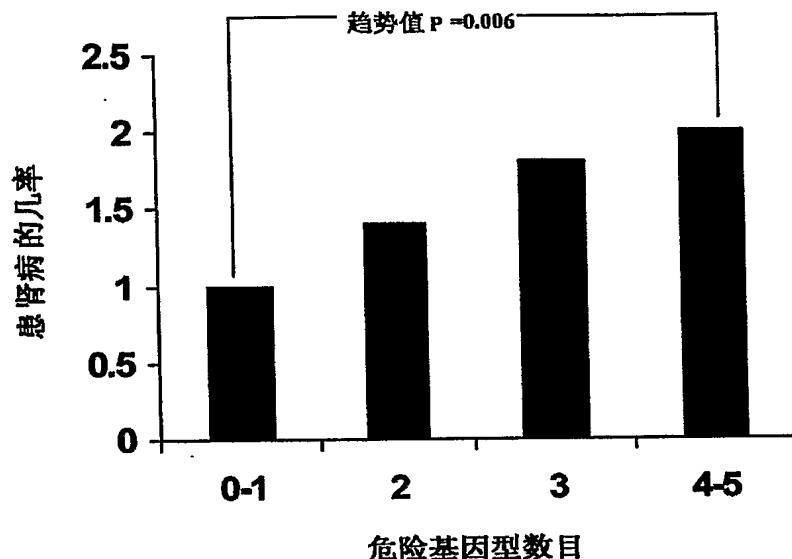


图 1

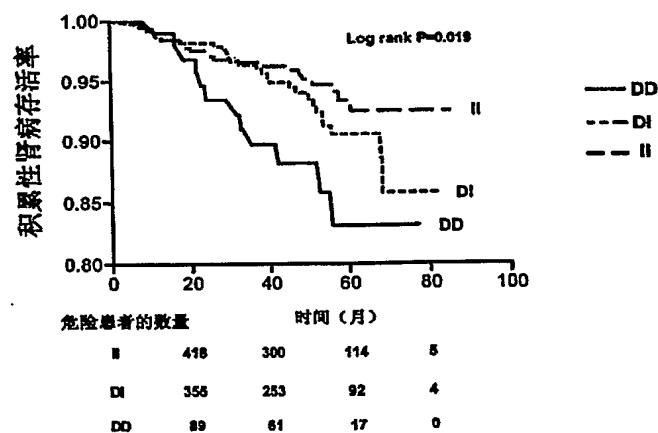


图 2

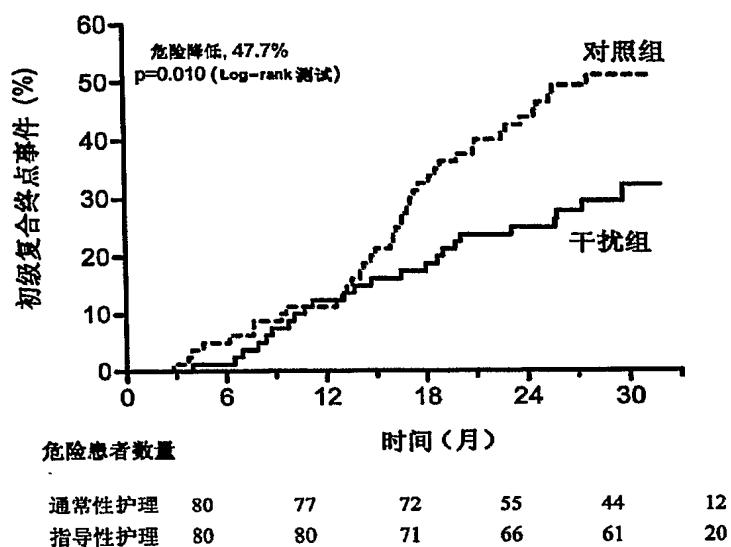


图 3A

5

10

15

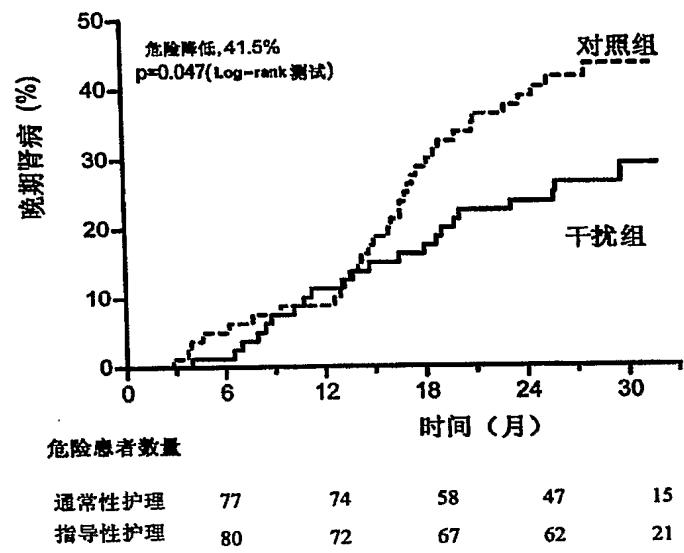


图 3B

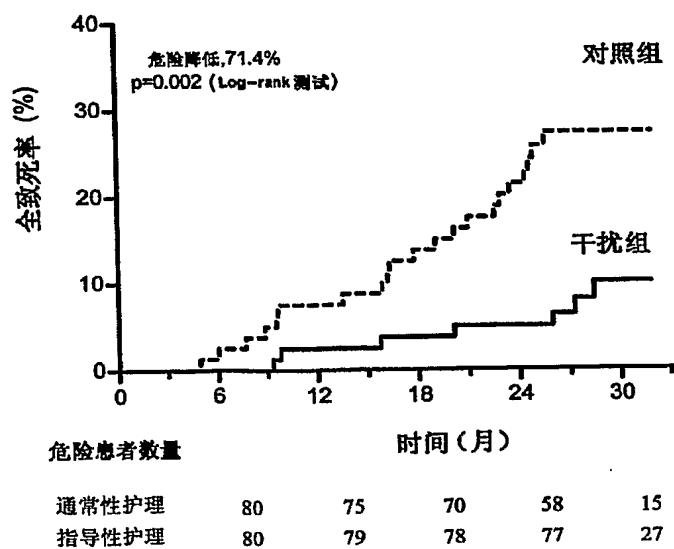


图 3C